

NOVELTY - A molecule that hybridises with nucleic acids and has a backbone of linearly linked monomer units, where at least one of the monomer units is a non-nucleoside unit containing an acid function with a pKa of less than 3.0, is new. DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following: (1) a molecule of formula (IV): where L = H, OH, 1-4C alkanoyl, an optionally protected nucleobase-binding group, 6-14C aryl, N-, O- and/or S-containing heterocyclyl, or an intercalator or reporter group; A = a spacer of 1-3 atoms; x = 0-3; E and F = COOX, CSOX, SO₂X, SO₃X or NR₁Y; R₁ = H or 1-3C alkyl; X = H or a protecting/activating group; Y = H or a protecting group; N = amine nitrogen; C and D = (CR₂R₃)_n or CR₂R₃CR₄R₅; R₂-R₅ = H, optionally substituted 1-6C alkyl, OH, COOH or an optionally protected group containing an acid function with a pKa of less than 3.0; n = 1-4; (2) a method for detecting the presence or absence of a nucleic acid in a sample suspected of containing one or more other nucleic acids, whose base sequence differs from that of the target nucleic acid in one or more positions, comprising contacting the sample with a probe whose base sequence is complementary to the target sequence but not to the base sequence of the other nucleic acids and determining if the probe has bound to its complementary base sequence and the probe is a molecule in which fewer than 80% but at least one of its bases are bonded to negatively charged backbone units; (3) use of negative charges in probes containing at least one non-nucleoside backbone unit to avoid nonspecific binding of the probes to (a) base sequences that are less than 50% complementary to the probes or (b) solid supports; (4) use of acid functions to increase the selectivity of probes in binding reactions; (5) use of molecules that hybridize with nucleic acids and have at least one base bonded to a negatively charged non-nucleoside backbone unit as primers for polymerase-catalysed extension with the aid of mononucleoside triphosphates; and (6) use of molecules that bind to nucleic acids and have at least one base bonded to a negatively charged non-nucleoside backbone unit for transfection into cells with the aid of transfection reagents.

USE - The oligonucleotides are useful in a method for the detection of mutations, alleles or polymorphisms or for the typing or subtyping of microorganisms (both claimed), for detecting viruses in body fluids, for detecting bacteria in foodstuffs, etc.

ADVANTAGE - Peptide nucleic acid (PNA) probes of type (1) give better signal dynamics and sensitivities at low salt concentrations than conventional DNA probes.



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 14/00, C07H 21/00, C12Q 1/68	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/33867
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/08317 (22) Internationales Anmeldedatum: 18. Dezember 1998 (18.12.98) (30) Prioritätsdaten: 197 57 516.1 23. Dezember 1997 (23.12.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERGMANN, Frank [DE/DE]; Faltergatter 5, D-82393 Iffeldorf (DE). VON DER ELTZ, Herbert [DE/DE]; In der Au 21, D-82362 Weilheim (DE). HERRMANN, Rupert [DE/DE]; In der Au 23, D-82362 Weilheim (DE). KÖHLER, Stefanie [DE/DE]; Würmstrasse 22a, D-82319 Starnberg (DE). SCHLÜTER, Volker [DE/DE]; Keplerweg 5, D-82152 Planegg (DE). (74) Anwalt: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. Juli 1999 (08.07.99) (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: MODIFIED NUCLEIC ACID ANALOGUES

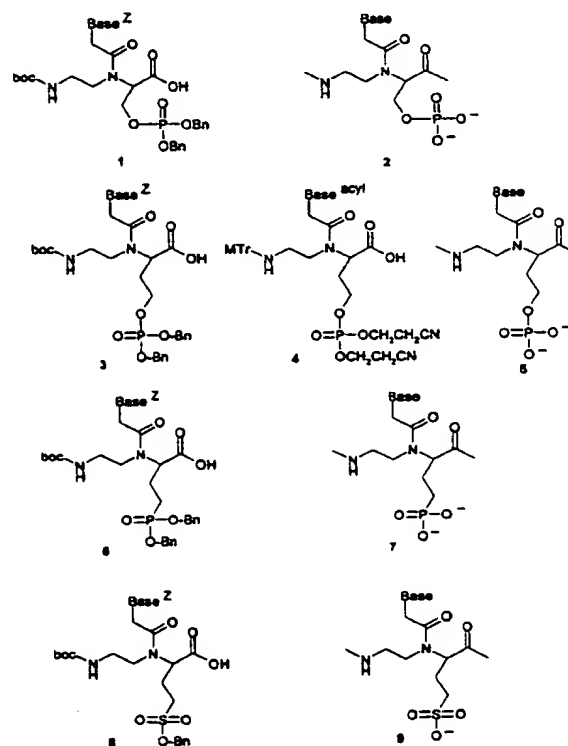
(54) Bezeichnung: MODIFIZIERTE NUKLEINSÄUREANALOGA

(57) Abstract

Oligomers comprising at least one non-nucleoside unit containing an acid function with a pK_a that is lower than 3.0 are particularly suitable as detection probes for nucleic acids as non-specific interactions are reduced in comparison with unmodified oligomers. Even when the concentration of hybridisation buffers is low, it is possible to obtain high signal dynamics and high sensitivity for a low blank signal. Said oligomers are also suitable as primers for lengthening reactions using polymerases and for transfection.

(57) Zusammenfassung

Oligomere mit mindestens einer nicht-nukleosidischen Einheit, die eine Säurefunktion mit einem pK_a von weniger als 3.0 enthält, eignen sich besonders als Nachweissonden für Nukleinsäuren, da die unspezifischen Wechselwirkungen verglichen mit unmodifizierten Oligomeren herabgesetzt sind und gerade bei niedrigen Salzkonzentrationen des Hybridisierungspuffers eine hohe Signaldynamik und Sensitivität bei niedrigem Leerwertsignal erreicht werden kann. Darüber hinaus eignen sie sich auch als Primer für Verlängerungsreaktionen mit Hilfe von Polymerasen und zur Transfektion.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshon	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Modifizierte Nukleinsäureanaloga

Gegenstand der Erfindung sind ein Verfahren zum Nachweis eines basensequenzhaltigen Targets in einer Probe unter Verwendung einer oder mehrerer spezieller Hybridisierungs-sonden, ein fester Träger, an den diese Hybridisierungssonde gebunden ist sowie die Verwendung negativer Ladungen in partiell geladenen Hybridisierungssonden zur Vermeidung unspezifischer Bindungen und zur Erhöhung der Selektivität bei Bindereaktionen.

Nachweise von Nukleinsäuren in Proben haben in den letzten Jahren in der Analytik beträchtlich an Bedeutung gewonnen. Insbesondere im Gesundheitswesen, wo der Nachweis von Krankheitserregern, wie Viren und Bakterien, in und außerhalb des Körper, sowie von körperlichen Zuständen, wie genetischen Veranlagungen für Krankheiten erforderlich ist, hat sich die Aussagekraft solcher Tests als nützlich erwiesen. Dies gilt umso mehr, seit es möglich ist, Basensequenzen aus den nachzuweisenden Nukleinsäuren spezifisch zu amplifizieren, beispielsweise mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, US-A-4,683,202). Im Allgemeinen werden die Proben, in denen die Anwesenheit der nachzuweisenden Nukleinsäure vermutet wird, mit einer Hybridisierungssonde in Kontakt gebracht, wobei die Sonde so gewählt wird, daß sie eine Basensequenz aufweist, die im wesentlichen komplementär zu einer Basensequenz der nachzuweisenden Nukleinsäure ist. Die Tatsache der Hybridisierung der Sonde mit der Nukleinsäure wird als Hinweis für die Anwesenheit der Nukleinsäure gewertet.

Als Hybridisierungssonden wurden zunächst fragmentierte, radioaktiv markierte Nukleinsäuren verwendet. Diese hatten jedoch den Nachteil, daß sie umständlich herzustellen und recht unrein waren. Durch Einführung automatisierter Nukleotidsynthesen wurde die Herstellung kurzer Nukleinsäuren (Oligonukleotide) in hoher Reinheit und mit definierter, freiwählbarer Basensequenz möglich. Die Einführung chemisch markierter Mononukleosidphosphoramidite ermöglichte die einfache Einführung von Labeln zum ungefährlichen, nicht-radioaktiven Nachweis. In jüngerer Zeit wurden auch Hybridisierungssonden gefunden, die überraschenderweise sehr fest an Nukleinsäuren binden, obwohl sie das für Nukleinsäuren typische Zucker-Phosphat-Grundgerüst nicht oder gemischt zusammen mit

anderen Grundgerüsteinheiten enthalten (z. B. WO 92/20703, EP-0 672 677 und EP-0 700 928). Diese Sonden sind einerseits hochaffin zu natürlichen Nukleinsäuren mit komplementärer Sequenz, sind andererseits aber auch hochselektiv. Aus Angew. Chem. 1996, 108, 17, 2068-2070), sind PNA bekannt, in deren Rückgrat eine Glycin-Einheit durch eine Glutaminsäure-Einheit ersetzt ist. Dadurch wird die Löslichkeit der Sonde erhöht. Es wurde auch festgestellt, daß ein Ersatz von Glutaminsäure durch Lysin keine wesentliche Änderung der Schmelzpunktniedrigung (ΔT_m) des vollständig komplementären PNA/DNA-Hybrids verglichen mit einem PNA/DNA-Hybrid mit einem mismatch mit sich bringt. Nachteile der bekannten PNA-Sonden sind die starke Tendenz zu unspezifischen Bindungen, zu hohen Leerwertsignalen und mangelnder Löslichkeit. DNA-Sonden haben den Nachteil, daß die Renaturierung eines Amplicon-Doppelstranges mit der Hybridisierung der (D)NA-Sonde in Konkurrenz tritt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile des Standes der Technik teilweise oder vollständig zu vermeiden, insbesondere die Ausnutzung der höheren Affinität von PNA-Sonden unter Vermeidung von unspezifischen Bindungen und hohen Leerwertsignalen. Auch die zusätzliche Unterdrückung der Rehybridisierung des Amplicons ist ein Vorteil der vorliegenden Erfindung (Verwendung von Niedrigsalzbedingungen).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein mit Nukleinsäuren hybridisierbares Molekül mit einem Grundgerüst aus linear miteinander verknüpften Monomereinheiten, wobei mindestens eine der Monomereinheiten eine nicht-nukleosidische Einheit ist, die eine Säurefunktion mit einem pK_a von weniger als 3.0 enthält. Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind Monomere für die Herstellung dieser Moleküle. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren mit Hilfe dieser Moleküle sowie die Verwendung von Säurefunktionen, bevorzugt mit einem pK_a von weniger 3.0, in Sonden zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Sonden an nicht-komplementäre Basensequenzen sowie an feste Träger, zur Erhöhung der Selektivität in Bindereaktionen, in Primern sowie in Molekülen zur Transfektion.

Mit Nukleinsäuren hybridisierende Moleküle, die nicht-nukleosidische Einheiten enthalten, sind prinzipiell bekannt. Sie lassen sich prinzipiell einteilen in Moleküle, die nur (nicht-natürliche) nicht-nukleosidische Einheiten enthalten, und Moleküle, die sowohl nicht-nukleosidische als auch (natürlich vorkommende) nukleosidische Einheiten enthalten. Ge-

meinsam ist all diesen Molekülen, daß sie aus Monomereinheiten aufgebaut sind. Diese sind so miteinander linear verknüpft, daß sich ein Oligomer mit einem fortlaufenden Grundgerüst (Backbone) ergibt, an welchem in im wesentlichen gleichmäßigen Abständen Liganden gebunden sind. Damit das Oligomer die Fähigkeit zur Hybridisierung mit Nukleinsäuren erhält, müssen einige dieser Liganden (im allgemeinen mehr als 6 Liganden) Nukleobasen der Nukleinsäure über Wasserstoffbrückenbindung erkennen und binden können. Solche Liganden sind beispielsweise die natürlich vorkommenden Nukleobasen, wie A, G, C, T und U, aber auch künstliche Heterozyklen, wie 7-Deazapurine oder Pseudopyrimidine. Darüber hinaus können diese Moleküle noch weitere Liganden enthalten, die nicht unbedingt zur Bindung mit der Nukleinsäure beitragen. Solche Liganden sind beispielsweise Gruppen, die dem Nachweis oder der Abtrennung der Moleküle in Verfahren zum Nachweis der Nukleinsäure dienen können. Solche Liganden können an die Nukleobasen, aber auch anstelle der Nukleobasen oder zusätzlich zu den Nukleobasen an das Grundgerüst, gebunden sein. Beispiele für solche Liganden sind beispielsweise in WO 92/20703, WO 95/14708 (Metallkomplexe), DE 197 12 530.1 und WO 95/16202 (Peptide) beschrieben.

Die Herstellung von mit Nukleinsäure hybridisierenden Molekülen, bei denen das Grundgerüst aus einer Sequenz von über Peptidbindungen verknüpften Monomereinheiten aufgebaut sind, ist beispielsweise in WO 92/20702 beschrieben. In einem ersten Aspekt unterscheidet sich der Gegenstand der vorliegenden Erfindung von der dort beschriebenen dadurch, daß mindestens eine der dort eingesetzten Monomereinheiten eine Funktion mit einem pK_a von weniger als 3.0 enthält.

In EP-A-0 672 677 ist eine Synthese von Nukleinsäureanalogen beschrieben, bei der nukleosidische und nicht-nukleosidische Monomereinheiten miteinander gemischt sind. In einer weiteren Ausführungsform unterscheidet sich der Gegenstand der vorliegenden Erfindung von den dort beschriebenen Molekülen dadurch, daß eine der nicht-nukleosidischen Monomereinheiten eine Säurefunktion mit einem pK_a von weniger als 3.0 enthält.

Wenn im Folgenden von einer modifizierten Monomereinheit gesprochen wird, so ist hiermit die nicht-nukleosidische Monomereinheit gemeint, welche die Säurefunktion mit einem pK_a von weniger als 3.0 bzw. die negative Ladung enthält. Als Monomereinheit wird bevorzugt eine Einheit verstanden, welche ein Teil des oben genannten Oligomers ist

und welche höchstens eine Nukleobase enthält. Diese Einheiten enthalten bevorzugt nur solche Molekülteile, die bereits in den zur Synthese der Oligomeren verwendeten Monomeren enthalten waren. In der Regel ist das Oligomer zwischen 6 und 100, bevorzugt 8 und 30 Monomereinheiten lang. Bei der Berechnung der Länge der Grundgerüsteinheit jedes Monomers wird im Folgenden zugrundegelegt, daß die geometrische Länge zwischen den Verknüpfungspunkten der einzelnen Monomere im wesentlichen gleich ist und bevorzugt mit den Verknüpfungsstellen der Monomeren, aus denen das Oligomer hergestellt ist, zusammenfällt. Für den bevorzugten Fall von Peptidnukleinsäuren beispielsweise reicht die Länge einer Grundgerüsteinheit von der Carbonylgruppe des einen Endes der Monomereinheit bis zum Aminoende derselben Monomereinheit, welche an die darauffolgende Carbonylgruppe der nächsten Monomereinheit gebunden ist. Bevorzugt liegt die Länge einer so definierten Grundgerüsteinheit zwischen 4 und 8, besonders bevorzugt bei 6 Atomen.

Die modifizierte Monomereinheit kann prinzipiell jede beliebige, also auch die letzte nukleobasenhaltige Monomereinheit des Moleküls darstellen. Besonders bevorzugt jedoch ist die modifizierte Monomereinheit nicht die letzte basenhaltige Monomereinheit des Oligomers. Besonders bevorzugt liegt die modifizierte Monomereinheit innerhalb des inneren Drittels der Gesamtlänge des Moleküls.

Das mit Nukleinsäuren hybridisierende Molekül kann prinzipiell so viele modifizierte Monomereinheiten enthalten, wie Monomereinheiten vorhanden sind. Bevorzugt ist es jedoch der Fall, daß weniger als die Hälfte der Monomereinheiten eine modifizierte Monomereinheit darstellen. Die übrigen Monomereinheiten sind bevorzugt nicht negativ geladen, bevorzugt sind sie neutral. Die Diskriminierung zwischen Nukleinsäuren mit einer in einer oder mehreren Positionen unterschiedlichen Basensequenz wird dadurch begünstigt, daß das Molekül so gewählt wird, daß die modifizierte Monomereinheit ungefähr in der Mitte des Moleküls eingebaut ist und zwar zu der nachzuweisenden, nicht aber mit einer davon zu diskriminierenden Nukleinsäure gerade in dieser Position komplementär ist (mismatch).

Unter einer nukleosidischen Einheit wird eine Einheit verstanden, die sowohl einen Zuckeranteil, als auch einen Phosphatanteil enthält. Eine nicht-nukleosidische Einheit ist somit eine Monomereinheit, in welcher die Base nicht an einen Zuckeranteil, oder/und der

Zuckeranteil nicht über einen Phosphatrest an eine benachbarte Monomereinheit gebunden ist.

Unter einer Säurefunktion wird im Sinne der vorliegenden Erfindung eine chemische Gruppe verstanden, die kovalent an die nicht-nukleosidische Einheit gebunden ist. Diese Gruppe hat in an die nicht-nukleosidische Einheit gebundener Form bevorzugt einen pK_s von weniger als 3.0. Bevorzugt sind 2- oder mehrbasige Säuren. Bevorzugte Säurefunktionen sind ausgewählt aus der Gruppe der anorganischen Säuren, insbesondere den Gruppen der Sulfonsäuren, der Phosphonsäuren oder der Phosphorsäuren bzw. deren Salze. Ein Sulfonsäurerest ist bevorzugt eine Gruppe der Formel $-SO_3H$. Unter einem Phosphonsäurerest wird bevorzugt ein Rest der Formel $-PO_3H_2$ verstanden. Phosphorsäuren enthalten die Gruppe $-OP(OH)_2O$. Die Säurefunktion ist bevorzugt nicht an der kovalenten Bindung zweier Monomereinheiten miteinander beteiligt. Insbesondere ist die Säurefunktion bevorzugt an ein Kohlenstoffatom des Grundgerüsts (Backbone) gebunden, welches nicht das erste neben einem für die Verknüpfung mit dem nächsten Monomeren verwendeten Heteroatom (O, P, S oder N) ist. Die Säurefunktion kann entweder direkt oder über einen Abstandshalter A' mit der Grundgerüsteinheit der Monomereinheit, bevorzugt einem Atom der fortlaufenden Kette von Atomen im Backbone, z. B. einem C-Atom, verbunden sein. Die Säurefunktion zusammen mit dem Abstandshalter A' wird im Folgenden auch als eine Gruppe R enthaltend eine Säurefunktion mit einem pK_s von weniger als 3.0 bezeichnet.

Der Abstandshalter A' verbindet ein Atom einer Reihe von linear aufeinanderfolgenden Atomen des Grundgerüsts mit einem Atom der Säurefunktion. Diese Abstandshalter können prinzipiell zwischen 1 und 20 Atomen lang sein. Besonders bevorzugt hat der Abstandshalter A' die Formel III



in der

A¹ Sauerstoff, NR⁶ oder Schwefel,

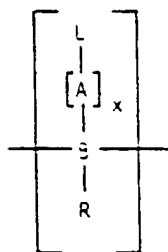
A² ein substituierter oder unsubstituierter Alkylen-, Alkinylen- oder Alkenylen-Rest.

- A³ Sauerstoff, Schwefel oder NR⁶,
 R⁶ unabhängig Wasserstoff, Acyl oder Alkyl,
 a und c unabhängig voneinander eine Zahl von 0 bis 2,
 b eine Zahl von 1 bis 10, und
 d eine Zahl von 1 bis 4

bedeuten, wobei der Abstandshalter in jeder der beiden möglichen Orientierungen eingebaut sein kann.

Alkyl, Acyl, Alkyl-, Alkinylen- und Alkenylen-Reste in der Definition von A² und R⁶ haben bevorzugt 1 bis 3 Kohlenstoffatome. Substituenten können beispielsweise gewählt werden aus der Gruppe Hydroxyl, Halogen (z. B. Cl, Br oder F) oder Amino.

Bevorzugt handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Molekül um ein mit Nukleinsäuren hybridisierendes Oligomer enthaltend mindestens eine nicht-nukleosidische Monomereinheit der Formel I



(I)

worin

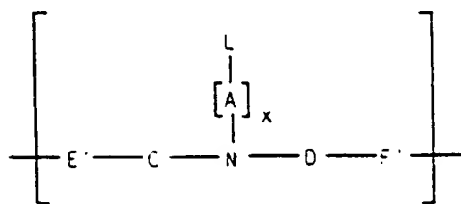
- L ausgewählt ist aus der Gruppe Wasserstoff, Hydroxyl, (C₁-C₄)-Alkanoyl, nukleobasenbindende Gruppe, (C₆-C₁₄)-Aromaten, Heterocyclen mit Stickstoff-, Sauerstoff- oder/und Schwefel-Atomen, Interkalatoren und Reportergruppen,
 A ein Abstandshalter mit einer Länge von 1 bis 3 Atomen,
 x eine Zahl zwischen 0 und 3,
 B eine Grundgerüsteinheit mit einer Länge von zwischen 4 und 8 Atomen,

R eine Gruppe enthaltend eine Säurefunktion mit einem pK_s von weniger als 3.0

bedeuten. Ein bevorzugter Alkanoylrest (Acylrest) ist die Acetylgruppe. Unter Nukleobasen sollen die natürlich vorkommenden Basen A, C, G, T und U verstanden werden. Eine nukleobasenbindende Gruppe ist eine Gruppe, die mit einer solchen Nukleobase über wasserstoffbrückenspezifische Wechselwirkungen ausbilden kann. Hierzu gehören neben den (hierzu komplementären) natürlichen Nukleobasen auch unnatürliche Nukleobasen, wie z. B. 7-Deazaguanosin oder Pseudopyrimidine. Aromaten können sowohl substituiert als auch unsubstituiert sein. Als Substituenten kommen insbesondere Hydroxyl, C_1 - C_2 -Alkoxy oder Amino in Frage. Bevorzugte Aromaten sind der Phenyl-, Pyrenyl- und der Naphthylrest. Heterozyklen sind zyklische Verbindungen, welche ein oder mehrere Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe O, N und S enthalten, die nicht-aromatisch oder aromatisch sein können. Auch sie können durch die bei Aromaten genannten Reste substituiert sein. Beispiele für Heterozyklen sind der Pyridylrest und der Piperidylrest. Interkalatoren sind Moleküle, die sich in die Basen-Basen-Wechselwirkung benachbarter Basen einschieben können, z. B. Acridin. Eine Reportergruppe kann zum Nachweis oder zur Immobilisierung des Moleküls verwendet werden. Insbesondere eignen sich immunologisch aktive Verbindungen und biospezifische Wechselwirkungen aus bindenden Molekülen aus Reportergruppen. Eine besonders bevorzugte Gruppe von Reportergruppen sind die Markierungen oder Label. Hier besonders bevorzugt sind die elektrochemilumineszenten Rutheniumbispyridylkomplexe.

Besonders bevorzugt ist L über den Abstandshalter A an ein Stickstoffatom, besonders bevorzugt an ein Aminstickstoffatom, in B gebunden. Ebenfalls bevorzugt ist die Gruppe R an die Grundgerüsteinheit, nicht jedoch direkt an das Stickstoffatom gebunden, an welches L gebunden ist.

Besonders bevorzugte Moleküle weisen mindestens eine Monomereinheit der Formel II auf



(II)

worin L, A und x die oben genannten Bedeutungen haben und

E' und F' unabhängig voneinander CO, CS, SO, SO₂ oder NR¹,

wobei R₁ ausgewählt ist aus der Gruppe Wasserstoff und (C₁-C₃)-Alkyl,

N ein Aminstickstoffatom, und

C und D unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe (CR²R³)_n und CR²R³CR⁴R⁵

wobei

R², R³, R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe

Wasserstoff, C₁-C₆-(substituiertes oder unsubstituiertes) Alkyl, Hydroxyl, Carboxyl und einer die Säurefunktion enthaltenden Gruppe R, und

n eine Zahl zwischen 1 und 4 ist.

Mindestens eine der Reste R²-R³, bzw. R²-R⁵ ist eine Gruppe R.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Molekül der Formel IV



in der

L ausgewählt ist aus der Gruppe Wasserstoff, Hydroxyl, (C₁-C₄)-Alkanoyl, nukleobasenbindende Gruppe in geschützter oder ungeschützter Form, (C₆-C₁₄)-Aromaten, Heterocyclen mit Stickstoff-, Sauerstoff- oder/und Schwefel-Atomen, Interkalatoren und Reportergruppen.

A ein Abstandshalter mit einer Länge von zwischen 1 und 3 Atomen.

x eine Zahl zwischen 0 und 3.

E und F unabhängig voneinander COOX, CSOX, SO₂X, SO₃X oder NR¹Y,

wobei

R¹ ausgewählt ist aus der Gruppe Wasserstoff und (C₁-C₃)-Alkyl,

X ausgewählt ist aus der Gruppe Wasserstoff, der Schutzgruppen und der Aktivierungsgruppen,

Y ausgewählt ist aus der Gruppe Wasserstoff und Schutzgruppe,

N ein Aminstickstoffatom und

C und D unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe (CR²R³)_n und CR²R³CR⁴R⁵

wobei

R², R³, R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe Wasserstoff, C₁-C₆-(substituiertes oder unsubstituiertes) Alkyl, Hydroxyl, Carboxyl und einer Säurefunktion mit einem pK_s von weniger als 3.0 enthaltenden Gruppe R in geschützter oder ungeschützter Form, und

n eine Zahl zwischen 1 und 4 ist.

Diese Moleküle sind zur Synthese der erfindungsgemäßen Oligomeren einsetzbar. Besonders bevorzugt sind dann solche Moleküle, bei denen einer der Reste E und F eine geschützte Amino- oder Carbonsäurefunktion ist und der andere entweder eine reaktive Gruppe, wie eine Carbonsäure- oder primäre Aminogruppe oder ein entsprechendes aktiviertes Derivat, z. B. ein Aktivester, bedeutet. Eine Aktivierungsgruppe ist beispielsweise 1-Oxybenzotriazol. Während der Oligomersynthese ist die Säurefunktion bevorzugt mit Hilfe einer Schutzgruppe geschützt, bevorzugt in Form eines Esters, der gespalten werden kann, ohne daß das Oligomer fragmentiert wird. Solche Schutzgruppen sind beispielsweise Benzyl und β-Cyanoethyl. Die z.B. aus der chemischen Oligonukleotidsynthese oder der Synthese von Peptidnukleinsäuren (WO 92/20702) bekannten Syntheseverfahren können analog zur Synthese der erfindungsgemäßen bzw. der erfindungsgemäß verwendeten Oligomeren verwendet werden.

Ein besonders geeignetes Monomer ist in Figur 1 angegeben (Verbindung 3). Es handelt sich hierbei um ein Derivat der Aminosäure Homoserin. Diese Verbindung ist am Amino-Ende der Grundgerüstmonomereinheit mit einer t-Butyloxycarbonyl(Boc)-Schutzgruppe an gegebenenfalls vorhandenen exozyklischen Aminogruppen der Base mit einer Benzyl-oxycarbonyl (Z)gruppe und an der Hydroxylgruppe des Homoserins durch Ersatz des Wasserstoff durch eine als Di-Benzylester geschützte Phosphatgruppe gekennzeichnet.

In Figur 1 ist weiterhin eine Verbindung (4) gezeigt, bei der die Aminogruppe der Grundgerüsteinheit mit einer Monomethoxytrityl-Schutzgruppe und die exocyclischen Aminofunktionen der Base mit einer Acyl-Schutzgruppe (Benzoyl, Isobutyryl) geschützt ist. Die Homoserinhydroxyl-Gruppe ist mit einem di- β -Cyanoethyl-geschützten Phosphatrest verestert. Als Verbindung 5 ist die entsprechende in das Oligomere eingebaute entschützte Monomereinheit gezeigt. Weiterhin sind in FIG 1 das entsprechende auf Serin als Aminosäure beruhende Monomer 1 und die entschützte Monomereinheit 2 gezeigt. Als Verbindungen 6, 7, 8 und 9 sind die auf Homoserin beruhenden Phosphonate und Sulfonate gezeigt. Die Abstandshalter zwischen der Säurefunktion (PO_4^{2-} , PO_3^{2-} und SO_3^-) und dem Kohlenstoffatom der linearen Backbonekette folgen bevorzugt der Formel $(\text{CH}_2)_n$, wobei n Werte von 1 bis 6, bevorzugt 2 bis 4 annimmt.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit einer Nukleinsäure in einer Probe, bei der zu vermuten ist, daß sie eine oder mehrere nicht-nachzuweisende Nukleinsäuren (zu diskriminierende Nukleinsäure(n)) enthält, deren Basensequenz sich von der Basensequenz der Nukleinsäure in einer oder mehreren Positionen unterscheidet, enthaltend die Schritte Inkontaktbringen einer Sonde, welche eine Basensequenz enthält, die zu der nachzuweisenden, nicht jedoch zu den anderen Nukleinsäuren komplementär ist, und Feststellung, ob eine Bindung der Sonde an eine zu der Basensequenz komplementäre Basensequenz stattgefunden hat, dadurch gekennzeichnet, daß als Sonde ein mit Nukleinsäuren hybridisierbares Molekül mit einem Grundgerüst aus linear miteinander verknüpften Monomereinheiten, wobei mindestens eine der Monomereinheiten eine nicht-nukleosidische Einheit ist, die eine Säurefunktion mit einem pK_a von weniger als 3.0 enthält, verwendet wird.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um eine spezielle Ausführungsform der sogenannten Hybridisierungstests, die in ihren Grundzügen dem Fachmann auf dem

Gebiet der Nukleinsäurediagnostik bekannt sind. Soweit experimentelle Details im Folgenden nicht ausgeführt sind, wird dazu vollinhaltlich auf "Nucleic acid hybridisation".

Herausgeber B.D. Hames und S.J. Higgins. IRL Press, 1986, z. B. in den Kapiteln 1 (Hybridisation Strategy), 3 (Quantitative Analysis of Solution Hybridisation) und 4 (Quantitative Filter Hybridisation), Current Protocols in Molecular Biology, Ed. F.M. Ausubel et al., J. Wiley and Son, 1987, und Molecular Cloning, Ed. J. Sambrook et al., CSH, 1989. Bezug genommen.

Unter einer Sonde wird allgemein ein nukleinsäurebindendes Molekül verstanden, welches von natürlichen Nukleinsäuren durch Anbringen einer chemischen Gruppe unterscheidbar gemacht wurde. Bei der chemischen Gruppe kann es sich einerseits um eine immobilisierbare Gruppe, andererseits um eine Markierung handeln. Diese Sonde enthält eine Basensequenz, die zu einer Sequenz der nachzuweisenden Nukleinsäure, nicht jedoch einer Sequenz der anderen, nicht-nachzuweisenden Nukleinsäuren komplementäre Basensequenz enthält. Diese Sequenz ist bevorzugt länger als 10 Basen. Bevorzugt ist die Sequenz fortlaufend und ununterbrochen. Die Länge der Sequenz beträgt bevorzugt 10 oder mehr Basen, besonders bevorzugt 15 oder mehr Basen. Die Sonde kann darüber hinaus noch weitere Basen enthalten, die die diskriminierenden Eigenschaften der Sonde nicht beeinflussen, da sie nicht zu einer stärkeren Bindung der Sonde an eine nicht-nachzuweisende Nukleinsäure führen als zu der nachzuweisenden. Im Allgemeinen ist dies sichergestellt, wenn diese Basen nicht zu einer Basensequenz komplementär sind, die direkt neben einer potentiellen Bindesequenz für die Sonde auf einer nicht-nachzuweisenden Nukleinsäure liegt. Solche zusätzlichen Basen können beispielsweise dazu verwendet werden, die Sonde selbst spezifisch über eine Nukleotidsequenz zu erkennen, z. B. zur Verwendung als universelle Nachweissonde.

Eine Markierung im Sinne der vorliegenden Erfindung besteht aus einer direkt oder indirekt nachweisbaren Gruppe L. Direkt nachweisbare Gruppen sind beispielsweise radioaktive (^{32}P), farbige, oder fluoreszierende Gruppen, Metalle oder Metallkomplexe. Indirekt nachweisbare Gruppen sind beispielsweise immunologisch oder enzymatisch wirksame Verbindungen, wie Antikörper, Antigene, Haptene oder Enzyme oder enzymatisch aktive Teilenzyme. Diese werden in einer nachfolgenden Reaktion oder Reaktionssequenz detektiert. Besonders bevorzugt sind Haptene, da an mit ihnen markierten Oligomeren die

Detektion über eine anschließende Reaktion mit einem markierten Antikörper gegen das Hapten leicht vorgenommen werden kann. Besonders gute Wirkung zeigt die Erfindung für lipophile Label, wie Biotin, Fluorescein, Pyrenyl oder Ruthenium-organische Komplexe.

Unter einer immobilisierbaren Gruppe wird ein chemischer Rest verstanden, welcher zur Bindung der Sonde an eine Festphase benutzt werden kann. Hierfür eignen sich daher sowohl aktivierbare Reste (z. B. photoaktivierbare), aber auch Partner eines spezifischen Bindepaares, wie Rezeptoren und zugehörige Liganden. Partner einer immunologischen Reaktion, wie z. B. Haptene, Antigene oder Antikörper, oder Vitamine bzw. Rezeptoren für diese Vitamine. Besonders bevorzugt als immobilisierbare Gruppe sind Haptene oder Biotin sowie dessen Derivate. Besonders bevorzugt ist Biotin. Die feste Phase, an welche die Sonde mittels der immobilisierbaren Gruppe gebunden werden kann, weist einen entsprechenden Bindungspartner oder eine entsprechende Reaktivität auf. Im Falle von Biotin kann daher die Festphase einen Überzug aus Streptavidin aufweisen.

Unter einer Analytnukleinsäure wird die Nukleinsäure verstanden, die Ziel des Nachweises ist. Darunter sind Nukleinsäuren jeglichen Ursprungs zu verstehen, beispielsweise Nukleinsäuren viroiden, viralen, bakteriellen oder zellulären Ursprungs. Sie können in Lösung, Suspension, aber auch an Festkörpern fixiert oder in zellhaltigen Medien, Zellabstrichen, fixierten Zellen, Gewebsschnitten oder fixierten Organismen vorliegen. Bevorzugt liegen die Nukleinsäuren in Lösung (in-vitro) vor.

Die Reaktionssequenz wird meist gestartet durch Verfügbarmachung der Analytnukleinsäure mit entsprechenden Reagenzien. Hierbei können sowohl Veränderungen des pHs (alkalisch), Hitze, Wiederholung extremer Temperaturveränderungen (Einfrieren/Auftauen), Veränderung der physiologischen Wachstumsbedingungen (Osmotischer Druck), Einwirkung von Detergenzien, chaotropen Salzen oder Enzymen (z. B. Proteasen, Lipasen), alleine oder in Kombination zur Freisetzung der Nukleinsäuren beitragen.

Denaturierung von Nukleinsäuren bedeutet Auftrennung von Nukleinsäuredoppelsträngen in Einzelstränge. Dem Fachmann stehen prinzipiell eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Verfügung, z. B. Behandlung durch Alkalihydroxide, durch Hitze, oder durch Chemikalien.

Unter einem spezifischen Nachweis wird ein Verfahren verstanden, durch welches gewünschtenfalls selektiv bestimmte Nukleinsäuren auch in Gegenwart anderer, hiervon zu diskriminierender, Nukleinsäuren nachgewiesen werden können. Es ist jedoch auch möglich, eine Gruppe von Nukleinsäuren mit teilweise übereinstimmender oder ähnlicher Nukleotidsequenz nachzuweisen. Zum Nachweis doppelsträngiger Nukleinsäuren kann jeder der beiden komplementären Stränge einbezogen werden. Bevorzugt ist daher die spezifische Sequenz der Sonde auf eine Länge von mehr als 10, bevorzugt mehr als 15 Basen zu mehr als 90, bevorzugt mehr als 95 und besonders bevorzugt zu 100 % komplementär zu einer Sequenz von gleichvielen ununterbrochen aufeinanderfolgenden Basen der nachzuweisenden Nukleinsäure. Besonders gute Wirkung zeigt die vorliegende Erfindung für Sequenzen, die besonders purinreich sind, d. h. mehr als 50 % Purine enthalten. Besonders bevorzugt ist sie für Sequenzen, die in einer ununterbrochenen Reihe 4 oder mehr Purine, z. B. G, enthalten. In diesem Falle liegt die erfindungsgemäß modifizierte Monomereinheit bevorzugt innerhalb dieses Homopurinbereiches.

Unter einer zu einer Nukleinsäure im wesentlichen komplementären Nukleinsäure oder Nukleinsäuresequenz werden Nukleinsäuren oder Sequenzen verstanden, die mit der entsprechenden Nukleinsäure hybridisieren können, deren Nukleotidsequenz im hybridisierenden Bereich entweder genau komplementär zu der anderen Nukleinsäure ist oder sich in wenigen Basen von der genau komplementären Nukleinsäure unterscheidet. Die Spezifität richtet sich dabei sowohl nach dem Grad der Komplementarität als auch nach den Hybridisierungsbedingungen.

Zwei Basen sind üblicherweise dann zueinander komplementär, wenn sie miteinander Basenpaarungen ausbilden können, die bevorzugt der Watson-Crick-Regel oder der Hoogsteen-Basenpaarung folgen. Die Komplementaritätsbedingung bezieht sich auf zwei oder mehr Basensequenzen mit direkt zueinander benachbarten Basen mit einer Länge von 10 oder mehr Basen. Genau komplementär heißt zu 100 % komplementär; bei Unterschieden sollten diese bei weniger als 10 %, bevorzugt weniger als 5 % der Basen innerhalb des hybridisierenden Bereiches liegen. Die Unterschiede müssen natürlich so gewählt werden, daß sie die Spezifität des Tests für die nachzuweisende Nukleinsäure nicht entscheidend verschlechtern.

Die nachzuweisende Nukleinsäure kann die Analytnukleinsäure selbst sein. Sie kann aber auch eine Nukleinsäure sein, die aus der Analytnukleinsäure durch Vorbehandlung in der Probenflüssigkeit hergestellt wurde. Zu den bekannten Vorbehandlungen gehört insbesondere die Fragmentierung, beispielsweise mittels Restriktionsenzymen, oder die cDNS-Synthese aus RNS. Damit das erfindungsgemäße Verfahren seine Vorteile voll entfalten kann, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, wenn die nachzuweisende Nukleinsäure eine Größe von mindestens 40 bp aufweist. Bevorzugt ist die nachzuweisende Nukleinsäure das Produkt einer vorgeschalteten spezifischen oder unspezifischen Nukleinsäurevermehrung. Solche Nukleinsäureamplifikationsverfahren sind beispielsweise aus EP-A-0 201 184, EP-A-0 237 362, EP-A-0 329 822, EP-A-0 320 308 oder WO 88/10315 bekannt. In diesen Verfahren dient die Analytnukleinsäure als Templatnukleinsäure für die Herstellung der letztendlich nachzuweisenden Nukleinsäure. Die Nukleinsäure kann jedoch auch eine durch Klonierung und in-vivo-Vermehrung hergestellte Nukleinsäure sein.

Beispielsweise kann ein Verfahren zum Nachweis eines speziellen Virus, z. B. HGV, in einer Körperflüssigkeit (z. B. Serum) als ersten Schritt die Lyse der Virushülle enthalten. Verfahren zur Lyse von Zellwänden sind dem Fachmann bekannt. Beispielsweise kann die Lyse durch Behandlung mit Alkalihydroxydlösungen vorgenommen werden. Auch der Zusatz von Hilfsstoffen, z. B. Detergenzien, ist möglich. Daran kann sich insbesondere bei Viren, welche nur in geringen Konzentrationen in Körperflüssigkeiten vorliegen (z. B. Hepatitis C-Virus), eine in-vitro Nukleinsäurevermehrung anschließen (z. B. über die Polymerase Chain Reaction oder die anderen oben genannten Amplifikationsverfahren). Dabei wird mit der Analytnukleinsäure als Templatnukleinsäure eine Vielzahl von Nukleinsäuren gebildet, welche dann in dem erfindungsgemäßen Verfahren nachgewiesen werden.

Bei einem Nachweis von Bakterien, beispielsweise in Lebensmitteln, könnten dem erfindungsgemäßen Verfahren ebenfalls mehrere Schritte vorgeschaltet werden. Im allgemeinen werden Bakterienproben ggf. nach in vivo Vermehrung der Bakterien unter Bedingungen, welche die Lyse der Bakterienzellwand bewirken (z. B. Proteinasen, Alkali), aufgeschlossen. Bei sehr niedrig konzentrierten Proben kann sich auch hier eine in vitro Amplifikation der Analytnukleinsäuren des Bakteriums anschließen.

Resultat der diversen Vorbehandlungen ist eine Probenflüssigkeit, welche Nukleinsäuren gelöst enthält und in der ggf. die in den vorbereitenden Schritten eingesetzten Reagenzien sowie gegebenenfalls zerstörte Zellbestandteile enthalten sind.

Für die Durchführung des spezifischen Nachweises mit Hilfe der Sonde gemäß der vorliegenden Erfindung stehen dem Fachmann bekannte Verfahren zur Verfügung. Diese beruhen im wesentlichen darauf, daß die nukleinsäurehaltige Probe mit der Sonde unter Bedingungen inkubiert wird, bei denen die Sonde spezifisch an die nachzuweisende Nukleinsäure bindet, jedoch nicht oder in untergeordnetem Ausmaß an die nicht nachzuweisenden Nukleinsäuren in der Probe. Wenngleich in den meisten Fällen die für die nicht-modifizierten Sonden geeigneten Reaktionsbedingungen für die Hybridisierung auch bei den erfindungsgemäßen Molekülen angewandt werden können (z. B. für PNA die in WO 92/20703 genannten Bedingungen), so hat es sich doch erwiesen, daß die Sensitivität und Dynamik mit abnehmender Salzkonzentration im Hybridisierungspuffer zunehmen. Dies ist vorteilhaft, da bei niedriger Salzkonzentration DNA-DNA-Hybridisierungen ungünstiger werden. Dies gilt insbesondere für den Fall der Renaturierung ursprünglich doppelsträngiger Analytnukleinsäuren gegenüber der Hybridisierung relativ kurzer erfindungsgemäßer Oligomere. Die erfindungsgemäßen Sonden zeigen ein gegenüber DNA-Sonden umgekehrtes Bild. Bei DNA-Sonden steigt mit zunehmender Salzkonzentration die Signaldynamik und Sensitivität. Für den bevorzugten Fall von erfindungsgemäß modifizierten PNA-Sonden hat sich gezeigt, daß die bevorzugte Konzentration von Salz (NaCl) bei zwischen 0 und 150 mM liegt. Ein Vergleich erfindungsgemäßer Sonden gegenüber DNA-Sonden ist in Figur 2 gezeigt. Im ersten Schaubild ist der Einfluß der Natriumchloridkonzentration auf die Sensitivität eines HGV-Tests unter Verwendung einer Rutheniumkomplex markierten DNA-Sonde bei verschiedenen Salzkonzentrationen gezeigt. Im zweiten Schaubild ist derselbe Versuch mit einer erfindungsgemäßen PNA-Sonde mit derselben Sequenz gezeigt, wobei der Rutheniumkomplex über zwei Glutaminreste an das PNA-Grundgerüst gebunden ist, und das Grundgerüst darüber hinaus zwei Glutaminreste enthält. Es ist erkennbar, daß die Salzabhängigkeit für die DNA-Sonde verglichen mit der PNA-Sonde unterschiedlich verläuft, obwohl die Sonde negative Ladungen enthält. Gerade bei niedriger Salzkonzentration, bei der die Renaturierung des Amplicon-Doppelstranges unterdrückt ist, ist die Signaldynamik und Sensitivität bei Verwendung partiell negativ geladener PNA-Sonden im Gegensatz zu DNA-Sonden optimal.

Im dritten Schaubild ist die Salzabhängigkeit einer Sonde gezeigt, welche zwei Lysinreste (positive Ladungen) im Backbone enthält. Es ist erkennbar, daß die Signaldynamik sowie Sensitivität kaum salzabhängig sind, die Leerwertsignale aber gerade bei niedrigen Salzkonzentrationen stark erhöht sind. Im vierten Schaubild ist die Salzabhängigkeit einer unmodifizierten, im Backbone neutralen PNA-Sonde mit zwei Glutaminsäureresten als Linker zum Rutheniumkomplex gezeigt. Auch hier steigt wie bei den partiell negativ geladenen PNA-Sonden Signaldynamik und Sensitivität zu niedrigen Salzkonzentrationen hin an, die optimale NaCl-Konzentration liegt bei 50 mM. Allerdings ist das Leerwertsignal deutlich erhöht.

Nach der Inkubation wird festgestellt, ob bzw. in welchem Ausmaß sich Hybride aus der nachzuweisenden Nukleinsäure und der Sonde gebildet haben. Zum Nachweis verwendet man die an der Sonde befindliche Markierung, deren Anwesenheit im Komplex aus nachzuweisender Nukleinsäure und Sonde zum Zeichen der Anwesenheit der nachzuweisenden Nukleinsäure verwendet wird. Dies geschieht bevorzugt, nachdem man einen eventuellen Überschuß an Sonde von dem Hybrid abgetrennt hat. Dies kann beispielsweise durch Abfangen des Hybrides mit Hilfe einer festphasengebundenen Fangsonde geschehen. Nach einer Inkubationszeit, während der die Immobilisierungsreaktion stattfindet, wird die flüssige Phase von der festen Phase (z. B. aus dem Gefäß, dem porösen Material oder den pelletierten beads) entfernt. Die Festphase kann anschließend mit einem geeigneten Puffer gewaschen werden.

Die Menge des an die Festphase gebundenen Hybrides aus nachzuweisender Nukleinsäure, Nachweissonde und Fangsonde kann auf im Prinzip bekannte Weise bestimmt werden, z. B. nach Art eines Sandwich-Hybridisierungsverfahrens. Bei diesem Verfahren wird das Hybrid mit der erfindungsgemäßen Nachweissonde umgesetzt, welche zu einer anderen Nukleotidsequenz der nachzuweisenden Nukleinsäure als die Fangsonde komplementär ist, und mit dieser hybridisiert. Dadurch bildet sich ein Hybrid aus Nachweissonde, nachzuweisender Nukleinsäure und Fangsonde an der Festphase. Ein solches Verfahren ist beispielsweise beschrieben in der EP-A-0 079 139. Bevorzugt wird die Nachweissonde der Probe zusammen mit der Fangsonde mit der Hybridisierungslösung zugegeben.

Bei direkt nachweisbaren Gruppen, beispielsweise Fluoreszenzlabeln, wird die Menge an Markierung fluorometrisch bestimmt. Ist die nachweisbare Gruppe indirekt nachweisbar

z. B. ein Hapten, so wird das Hybrid bevorzugt mit einem markierten Antikörper gegen das Hapten umgesetzt, wie analog in der EP-A-0 324 474 beschrieben. Die Markierung am Antikörper kann beispielsweise eine Farb- oder Fluoreszenzmarkierung oder bevorzugt eine Enzymmarkierung, wie β -Galactosidase, alkalische Phosphatase oder Peroxidase, sein. Im Falle der Enzymmarkierung wird die Menge an Nukleinsäure über die meist photometrische chemoluminometrische oder fluorometrische Verfolgung einer Reaktion des Enzyms mit einem chromogenen, chemoluminogenen oder fluorogenen Substrat gemessen. Das Meßsignal ist ein Maß für die Menge ursprünglich vorhandener nachzuweisender Nukleinsäure und somit ggf. an nachzuweisenden Organismen.

Besonders bevorzugt unterscheidet sich die nicht-nukleosidische, modifizierte Grundgerüsteinheit an einer Position, in welche sich die nachzuweisende Nukleinsäure von einer der in der Probe vorhandenen nicht-nachzuweisenden Nukleinsäure unterscheidet, von mindestens einer der beiden benachbarten Grundgerüsteinheiten, womit nicht die Base gemeint sein soll. Dies kann beispielsweise dadurch realisiert werden, daß die benachbarte Grundgerüsteinheit nicht eine negative Ladung bzw. nicht die Säurefunktion aufweist, oder daß sie auf einer anderen Monomereinheit, z.B. einer anderen Aminosäure, im linearen Teil des Grundgerüsts basiert.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Probe, die die nachzuweisende Nukleinsäure neben anderer Nukleinsäuren enthält, so behandelt, daß die nachzuweisende Nukleinsäure aus eventuell vorhandenen Zellen freigesetzt und eventuell daran haftende Proteine denaturiert werden. Daran kann sich eine Isolierung der Nukleinsäuren aus diesem Gemisch anschließen. Die von eventuellen Inhibitoren der Amplifikation befreiten Nukleinsäuren können dann einer Amplifikation, z. B. einer PCR, unterzogen werden. Hierbei ist es bevorzugt, einen der Primer mit einer immobilisierbaren Gruppe markiert einzusetzen. Nach Durchlaufen der Amplifikation werden die Amplifikate durch Hybridisierung mit einer erfindungsgemäßen Sonde nachgewiesen. Die Sonde wird bevorzugt so gewählt, daß sie in einen Bereich zwischen den Hybridisierungspositionen der Primer mit den Amplifikaten hybridisiert. Die Detektion findet nach Immobilisierung der Amplifikate und Hybridisierung mit der Sonde statt. Hierzu können bevorzugt magnetische Partikel eingesetzt werden, welche die immobilisierbare Gruppe der Amplifikate erkennen. Die Reagenzlösung mit den überschüssigen Sonden wird vor der Detektion bevorzugt entfernt.

Die erfindungsgemäßen Oligomere, insbesondere diejenigen mit einer Säurefunktion mit einem pK_a von weniger als 3.0 eignen sich hervorragend zum Nachweis von Mutationen, Allelen oder Polymorphismen sowie zur Typisierung oder Subtypisierung von Mikroorganismen. Bevorzugt enthalten die Oligomere sowohl eine solche Säurefunktion innerhalb des Bindebereiches des Oligomeren mit der nachzuweisenden Nukleinsäure als auch eine negative Ladung ausserhalb des Bindebereiches, z.B. an dessen Ende(n) oder im Linker zwischen dem Bindebereich und der Markierung.

Darüber hinaus hat es sich erwiesen, daß Oligomere, bei denen weniger als 80, bevorzugt weniger als 50 und besonders bevorzugt weniger als 40 %, mindestens jedoch eine der Basen an eine negativ geladene Grundgerüsteinheit, z. B. eine durch eine Säurefunktion mit einem pK_a von weniger als 5.0, bevorzugt weniger als 3.0, modifizierte, gebunden sind, deutlich weniger unspezifisch an in ihrer Sequenz relativ unverwandte Nukleinsäuren (z. B. Längenmarker) binden. Sie vermeiden daher unspezifische Bindungen in Reaktionen zur Bindung der Sonde an komplementäre Basensequenzen (Tabelle 1). Unter relativ unverwandten Nukleinsäuren werden Nukleinsäuren verstanden, die keine fortlaufende und ununterbrochene Sequenz von mehr als 10, bevorzugt mehr als 15 Basen enthalten, die zu mehr als 50 % zu einer gleichlangen ununterbrochenen und fortlaufenden Sequenz von Basen der Sonde komplementär sind. Leerwerte, insbesondere bei Elektrochemilumineszenzmessungen, werden reduziert. Gegenüber nicht-modifizierten Peptidnukleinsäuren zeichnen sich die erfindungsgemäßen Oligomere durch eine erhöhte Selektivität in Bindereaktionen aus. In Abgrenzung zu Oligomeren, bei denen eine positive Ladung am Backbone befestigt war (z. B. T-Lys-haltige PNAs) und zu neutralen PNAs wurden deutlich niedrigere Leerwertsignale erhalten, insbesondere bei abnehmender Salzkonzentration (Tabelle 1). Die erfindungsgemäßen Oligomere neigen auch weniger zu unspezifischen Bindungen an Festphasen, z. B. hydrophile Oberflächen, wie mit Streptavidin beschichtete Partikel oder Gefäße. In diesem Fall wird als unspezifische Bindung eine nicht auf Basen-Basen-Wechselwirkung beruhende Bindung verstanden. Für den Einsatz der erfindungsgemäßen Oligomere eignen sich insbesondere neutrale und ganz besonders negativ geladene Oberflächen.

In Angew. Chem. 1996, 108, 17, 2068 sind PNAs mit Glutaminsäure-haltigem Backbone beschrieben. Auch solche Oligomere können zur Vermeidung unspezifischer Bindungen an

nicht-komplementäre Nukleinsäuren oder Festphasen verwendet werden. Als Sonden in Vergleichsversuchen wurden jeweils 18mere bzw 14mere eingesetzt. Die Sonden unterscheiden sich wie in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 1:

Ident Nr	504	505	506	55	484
	18mer	18mer	18mer	18mer	14mer
	counts/100	counts/100	counts/100	counts/100	counts/100
Konz	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml
HGV Bi-Primer, 7ng	50	15	9	9	17
HGV Bi-Primer, 14ng	56	15	9	5	17
HGV Bi-Primer, 28ng	75	19	10		17
Bi-Marker VI, 250ng	51	15	9	10	37
Bi-Marker VI, 1250ng	75	17	9	8	107
1:100	4229	3913	2241	4020	4410
1:1000	543	461	314	501	521
1:10000	86	53	35	50	51
1:100000	42	13	9	9	16
1:1000000	45	15	11	9	15
HBV PCR-Prod.	74	15	9	9	39
Denat.	40	12	9	9	14
Denat.	37	11	9	9	15

Tabelle 2:

Nummer	Art	Linker	Backbone
1	PNA	3 Gly	2 Glu
2	PNA	Ado	2 Glu
3	PNA	2 Glu	2 Glu
4	DNA	-	-
5	PNA	3 Gly	-

In Tabelle 1 ist gezeigt, daß die partiell negativ geladenen PNA-Sonden ungeladenen PNAs bezüglich unspezifischer Bindung an nicht-komplementäre DNA-Fragmente deutlich überlegen sind und ein ähnliches Verhalten wie eine vergleichbare DNA-Sonde gleicher Basensequenz zeigen. In der linken Spalte ist erläutert, welche Nukleinsäurekomponenten dem Nachweisverfahren zugrundegelegt wurden. Im ersten Fall wurden biotinmarkierte HGV-Primer in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, die keine mit der Sonde komplementäre Sequenz enthalten. Im zweiten Fall wurden biotinmarkierte Längenmarker eingesetzt, die ebenfalls keine wesentliche Komplementarität zur Sonde aufweisen. Im dritten Fall wurden HGV-Amplifikate in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt. Die Amplifikate enthalten einen Bereich, der zu 100 % komplementär zu der Sondensequenz ist. Im vierten Fall wird das Amplifikat eines HBV-Tests eingesetzt.

Dieses Amplifikat hat keine Komplementarität zur eingesetzten Sonde. Im fünften Fall werden keine Nukleinsäuren zugegeben, so daß nur die unspezifische Bindung der Sonde an die Oberfläche des Magnetpartikels gemessen wird.

Die Ergebnisse aus Tabelle 1 zeigen, daß selbst bei Nichtanwesenheit von Nukleinsäuren in der Reaktionsmischung ein Leerwertsignal gemessen wird (Fall 5). Dieses ist bei DNA-Sonden und bei PNA, welche sowohl im Backbone als auch im Linker negative Ladungen enthalten, ähnlich klein. Demgegenüber steigt das Leerwertsignal bei Entfernen der negativen Ladung im Linker etwas an. Besonders groß ist das Leerwertsignal bei ungeladenen PNA. Dies zeigt, daß mit negativ geladenen PNA-Sonden eine Reduzierung des Leerwertes erreicht werden kann.

Die Fälle 1 und 2 zeigen ferner, daß auch unspezifische Bindungen an Nukleinsäuren, die keine Ähnlichkeit mit der zu der Sondensequenz komplementären Sequenz haben, ein Beitrag zum Leerwertsignal liefern. Dies gilt sowohl für die zwangsläufig in der Reaktionsmischung enthaltenen Primer, als auch Kontrollen, wie Standards. Auch hier wird durch Einsatz negativ geladener Sonden eine Reduktion des Leerwertes festgestellt. Dieser Beitrag konnte im vorliegenden Experiment sogar vollständig eliminiert werden.

Fall 4 zeigt, daß bei Anwesenheit von Amplifikaten, die beispielsweise auf eine simultane Amplifikation eines weiteren Analyten in der Reaktionsmischung zurückzuführen sind, ein beträchtliches Leerwertsignal gefunden wird, welches durch Einsatz negativ geladener Sonden praktisch eliminiert werden kann.

Bevorzugt findet die Reaktion in einem Kunststoffgefäß statt. Insbesondere sind dabei solche Gefäße einsetzbar, welche normalerweise in üblichen Analysenautomaten als Probenaufbewahrungsgefäße verwendet werden. Beispiele sind Gefäße aus Polystyrol, Polyethylen oder Luran. Während der Behandlung mit Alkali und Detergenz befindet sich das Gefäß, in dem die Behandlung stattfindet, bevorzugt schon in einem Analysenautomaten, besonders bevorzugt auf einem Probenrotor, welcher den Zugriff einer Probenentnahmevorrichtung auf einzelne auf dem Rotor befindliche Probengefäße zuläßt. Ein solcher Analysenautomat ist beispielsweise in EP-A-0 361 830 beschrieben.

Darüber hinaus eignen sich diese Oligomere, bei denen weniger als 80, bevorzugt weniger als 50 %, jedoch mindestens eine der Basen an negativ geladene Grundgerüsteinheiten gebunden sind, besonders bevorzugt die erfindungsgemäßen Oligomere, hervorragend als Primer, sofern sie an einem Ende eine durch eine Polymerase verlängerbare Gruppe, vorzugsweise eine Hydroxylgruppe, aufweisen. Primer, die aus konventionellen Mononukleotideinheiten und einem oder mehreren Nukleosideinheiten am C-Ende aufgebaut sind, sind in WO 95/08556 und EP-0 672 677 beschrieben. Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß bei Einbau einer oder mehrerer negativer Ladungen im Bereich des verlängerbaren Endes die Wirkung als Primer verbessert wird. Besonders geeignet als Primer haben sich erfindungsgemäße Oligomere, die an einem ihrer Enden eine verlängerbare Hydroxylgruppe, z. B. Nukleoside, und als nächste Monomereinheit eine nicht-nukleosidische Einheit, die eine Säurefunktion mit einem pK_a von weniger als 5.0, bevorzugt weniger als 3.0 enthält, erwiesen. Diese Chimären können mit den erfindungsgemäßen Monomeren analog zu WO 95/08566 hergestellt werden.

Erstaunlicherweise können Oligomere, bei denen weniger als 80 %, bevorzugt weniger als 50 %, jedoch mindestens eine der Basen an negativ geladene Grundgerüsteinheiten gebunden sind, besonders bevorzugt die erfindungsgemäßen Oligomere im Vergleich zu unmodifizierten, neutralen PNAs, z. B. mit sogenannten Transfektionsreagenzien, z. B. DOSPER oder DOTAP, besser in Zellen eingeschleust werden. Solche Transfektionsreagenzien sind für Nukleinsäuren aus Bioforum 6/96, Seite 264, bekannt. Insbesondere in Form von Peptidnukleinsäuren, die außerdem den Vorteil der Stabilität gegenüber Enzymverdau und eine hohe Affinität der Nukleinsäuren aufweisen, können die erfindungsgemäßen Oligomere daher gut in der Antisense-Technologie oder als Gensonden verwendet werden.

Im Falle der Oligomeren, welche eine Reduzierung der unspezifischen Bindungen mit sich bringen, können die negativen Ladungen prinzipiell im Molekül verteilt sein. So ist es beispielsweise möglich, die negativen Ladungen in Form einer oben beschriebenen Gruppe mit einem pK_a von weniger als 5.0 (3.0) an eine basetragende Grundgerüsteinheit zu binden, es ist jedoch auch möglich, diese außerhalb der Sequenz von basenhaltigen Grundgerüsteinheiten zu binden, z. B. an einem oder beiden Enden der Oligomeren oder an die Nukleobase selbst (z.B. DE- 19712530). Es hat sich herausgestellt, daß in diesem Fall die negativen Ladungen vorteilhafterweise über zusätzliche, nicht-basetragende Grund-

gerüsteinheiten, welche eine Gruppe mit einem pK_a von weniger als 5.0 (3.0) enthalten, an einem Ende der Basensequenz zu realisieren, wobei an einem oder mehreren dieser zusätzlichen Grundgerüsteinheiten auch die Markierung oder die immobilisierbare Gruppe lokalisiert ist. Für den Fall von Peptidnukleinsäuren hat es sich als äußerst zweckmäßig erwiesen, schon während der Synthese der PNAs weitere Grundgerüsteinheiten aus Aminosäuren mit einem pK_a von weniger als 5.0 (3.0) anzukondensieren und in einem anschließenden Schritt die Markierungsgruppe an die zusätzlichen Grundgerüsteinheiten zu binden. Dadurch wirken die zusätzlichen Grundgerüsteinheiten auch als Linker zwischen der Markierung und der für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifischen Basensequenz. Besonders vorteilhaft erscheinen solche Sonden, bei denen sowohl negative Ladungen innerhalb der Basensequenz vorliegen, als auch im Linker.

In Fig. 1 sind einige Formeln erfindungsgemäßer Monomere (1, 3, 4, 6 und 8) in geschützter Form, wie sie zur Oligomersynthese eingesetzt werden können sowie die damit erzeugten Monomereinheiten innerhalb einer PNA (2, 5, 7 und 9), gezeigt (Z: Benzyloxycarbonyl, Bn: Benzyl).

In Fig. 2 ist der Einfluß des Salzgehaltes auf das Signal für eine markierte DNA-Sonde, eine erfindungsgemäße markierte Sonde, eine positiv geladene PNA-Sonde und eine Sonde mit negativer Ladung nur im Linker (ausserhalb des Backbones) gezeigt.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher:

Beispiel 1

Synthese der Monomeren

Synthese des Boc-T-D-Glu(Bn)-OH PNA-Monomers

1. Synthese von D-Glu(Bn)-O-Allyl

Man gibt unter Rühren zu einer Lösung von 10 g (29.6 mmol) Boc-D-Glu(Bn)-OH (erhältlich von der Fa. Novabiochem AG) in 100 ml absolutem DMF 9.64 g (29.6 mmol) Cäsiumcarbonat (Fluka) und nach einer ¼ Stunde 7.16 g (59.2 mmol) Allylbromid (Fluka) und rührt eine ¾ Stunde weiter. Danach filtriert man vom Feststoff ab und zieht das DMF im Vakuum ab. Der Rückstand wird in 400 ml Essigester aufgenommen und mit 400 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Danach wird die wäßrige Phase noch dreimal mit je 200 ml Essigester rückextrahiert. Anschließend werden die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Man filtriert ab und rotiert ein. Jetzt wird der Rückstand in 100 ml Benzol gelöst und mit 5.80 g (30.5 mmol) p-Toluolsulfonsäure versetzt. Man kocht 1 Stunde lang am Rückfluß, engt danach die Lösung auf ein Volumen von ca. 20 ml ein und kristallisiert das Produkt durch langsame Zugabe von Diethylether aus. Der Feststoff wird abfiltriert und aus Methanol/Diethylether umkristallisiert. Man erhält nach Trocknen am Hochvakuum 11.1 g (77%) des Produkts als p-Toluolsulfonsäure-Salz in Form farbloser Kristalle.

2. Synthese von Boc-(2-Aminoethyl)-D-Glutaminsäure-γ-Benzylester-α-Allylester

8 g (16.4 mmol) D-Glutaminsäure-γ-Benzylester-α-Allylester werden mit je 400 ml Dichlormethan und gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung in einem Scheidetrichter geschüttelt. Nach Abtrennen der organischen Phase wird die wäßrige Phase dreimal mit je 200 ml Dichlormethan rückextrahiert. Man trocknet die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 , filtriert ab und rotiert ein. Der Rückstand wird in 60 ml Methanol gelöst und im Eisbad gekühlt. Danach gibt man unter Rühren 3.14 g (19.7 mmol) Boc-Aminoacetaldehyd (hergestellt nach K.L. Dueholm et al., Org. Prep. Proced. Int. 1993, 25, 457-461) zu und rührt eine ½ Stunde im Eisbad weiter. Danach wird mit 1.1 ml Essigsäure und 0.55 g (8.75 mmol) Natriumcyanoborhydrid versetzt. Nach ½ Stunde wird das Methanol im Vakuum abgezogen, und der Rückstand in 300 ml Essigester aufgenommen. Die Lösung wird mit 150 ml einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 150 ml

Kochsalz-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird anschließend über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und einrotiert. Der Rückstand wird in 120 ml Diethylether aufgenommen, auf -20°C gekühlt und mit der äquivalenten Menge 1.5 M wasserfreier, etherischer HCl versetzt. Danach gibt man 120 ml absolutes Hexan zu. Das ausgefallene Hydrochlorid wird abfiltriert. Nach Umkristallisation aus Methanol/Diethylether/Hexan erhält man 7.15 g (88%) farblose Kristalle.

3. Synthese von Boc-T-D-Glu(Bn)-O-Allyl

Zu einer Lösung von 3.72 g (20.2 mmol) Thymin-1-ylessigsäure (hergestellt nach K.L. Dueholm et al., J. Org. Chem. 1994, 59, 5767-5773) und 3.3 g (20.2 mmol) 3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin (Fluka) in 60 ml DMF gibt man unter Rühren 4.37 g (21.2 mmol) DCC (Fluka). Nach 1 Stunde gibt man dann 5 g (10.1 mmol) Boc-(2-Aminoethyl)-D-Glutaminsäure- γ -Benzylester- α -Allylester Hydrochlorid und 1.75 ml (10.2 mmol) Hünigs Base. Man rührt über Nacht bei 40°C (ca. 15 h). Danach wird das DMF im Vakuum abgezogen und der Rückstand in 180 ml Essigester aufgenommen. Der gebildete Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert. Die organische Phase wird dann sukzessive mit je 150 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, halbgesättigter Kaliumhydrogensulfat-Lösung und gesättigter Kochsalz-Lösung gewaschen, danach über Na_2SO_4 getrocknet. Man filtriert ab und rotiert ein. Der Rückstand wird über eine Kieselgelsäule mit Essigester/Hexan 2:1 als Elutionssystem gereinigt. Das Produkt wird dann mit Essigester/Diethylether zur Kristallisation gebracht. Ausbeute: 3.6 g (57%).

4. Synthese von Boc-T-D-Glu(Bn)-OH

Zu einer Lösung von 2 g (3.2 mmol) Boc-T-D-Glu(Bn)-O-Allyl und 2.8 ml (32 mmol) Morpholin in 30 ml absolutem THF gibt man 37 mg (0.032 mmol) Tetrakis(triphenylphosphin)-Palladium. Nach $\frac{1}{2}$ Stunde wird das THF abgezogen. Der Rückstand wird in 100 ml Essigester aufgenommen und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, die mit Kaliumhydrogensulfat-Lösung auf pH 3 eingestellt wurde, gewaschen. Die wäßrige Phase wird danach 5x mit je 50 ml Essigester rückextrahiert. Danach werden die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Kochsalz-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Man filtriert ab und rotiert ein. Nach Kristallisation aus Essigester/Hexan erhält man 1.46 g (78%) eines fast farblosen Feststoffs.

¹H-NMR (DMSO): COOH nicht sichtbar. 11.27 (sb, 1H, NH). 7.36-7.30 (m, 6H, Ph, H-C(6)), 6.99 (sb, 1H, NH). 5.10 (2s, 2H, CH₂Ph), 4.61-4.49 (m, 2H, CH₂Thy), 4.20-4.05 (m, 1H, CH). 3.68-2.91 (t, t, m, 6H, 2x CH₂N, CH₂COO). 2.39-2.31 (m, 2H, CH₂), 1.74 (s, 3H, CH₃), 1.38, 1.35 (2s, 9H, CH₃ (Boc))

Beispiel 2

Synthese der Oligomeren

Synthese der PNA der Sequenz:

Ru(bpy)₃ (Glu)₂ CCA C(T-Glu)A TAG G(T-Glu)G GGT CTT Gly

Die Synthese erfolgte auf einem ABI 433A Peptid-Synthesizer der Firma Applied Biosystems mit modifizierter Software (T. Koch et al., J. Peptide Res. 1997, 49, 80-88). Die Synthesen wurden im 5 µmol Maßstab in einem 3 ml Reaktionsgefäß durchgeführt, ein kleineres Measuring Loop (150 µl) wurde verwendet. Die Monomerbausteine (PNA-Bausteine: Boc-T-OH, Boc-A(Z)-OH, Boc-C(Z)-OH und Boc-G(Z)-OH, erhältlich von der Fa. Perseptive Biosystems, Boc-T-Glu(Bzl)-OH hergestellt nach Beispiel 1; Aminosäure-derivate: Boc-Glu(OBzl)-OH, erhältlich von der Fa. Novabiochem AG; Ru(Ruthenium)(bpy)₃-COOH von Boehringer Mannheim) wurden in NMP gelöst und in individuelle Kartuschen eingespritzt (140 µl, 0.26M). Das mit Boc-Gly (Novabiochem AG) derivatisierte MBHA-Trägermaterial (Novabiochem AG) wird in das 3 ml Reaktionsgefäß gefüllt und am Synthesizer angebracht. Trifluoressigsäure/m-Cresol 95:5 (2 x 180 sec; Flaschenposition 2) wird verwendet, um die Boc-Schutzgruppe abzuspalten. Je 2 Waschmodule (Dichlormethan- und NMP-Modul bestehend aus jeweils 5 aufeinanderfolgenden Waschschritten) befinden sich zwischen Boc-Abspaltung und dem Kupplungsmodul (Dichlormethan = Flaschenposition 9; NMP = Flaschenposition 10). 140 µl 0.26 M Monomer (36 µmol), 150 µl 0.21 M HATU (O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat) in NMP (32 µmol) und 150 µl 0.5 M Diisopropylethylamin in NMP (75 µmol) werden in jedem Kupplungsschritt gefördert (Diisopropylethylamin-Lösung = Flaschenposition 7; HATU-Lösung = Flaschenposition 8). Die Monomere werden in der Synthesekartusche voraktiviert (1 min), dann in das Reaktionsgefäß überführt. Die Kupplungszeit beträgt 10 min. die Monomerenkonzentration während der Kupplung beträgt 0.08 M. Nach dem Kupplungsmodul erfolgt ein Capping-Modul mit

Essigsäureanhydrid/NMP/Pyridin 1:25:25 (1 min; Flaschenposition 4). Jeder Synthesecyclus wird mit einem NMP Waschmodul abgeschlossen. Nach dem letzten Synthesecyclus folgt ein Dichlormethan-Waschmodul, um das Harz zu trocknen. Die Kupplungen wurden regelmäßig durch einen qualitativen Kaiser-Test kontrolliert.

Die Abspaltung der PNA vom Harz und der Schutzgruppen erfolgt in einem manuellen Schritt außerhalb des Gerätes in einer speziellen, verschließbaren Glasfritte. Das Harz wird zuerst mit Trifluoressigsäure gewaschen, dann schüttelt man 2 Stunden mit 2 ml Trifluormethansulfonsäure/Trifluoressigsäure/m-Cresol 2:8:1. Die Abspatlösung wird in ein Zentrifugenglas gesaugt. Man wäscht mit 1 ml Trifluoressigsäure nach und präzipitiert die PNA mit Diethylether (ca. 10 ml). Das Präzipitat wird nach Zentrifugation von der überstehenden Lösung getrennt. Danach wäscht man zweimal mit Diethylether.

Die PNA wurde über eine analytische RP18-HPLC (DeltaPak, Waters, 5 μ , 125 x 4 mm) mit einem Wasser/Acetonitril/0.1 % Trifluoressigsäure-Gradienten bei 60 °C analysiert.

Die PNA wurde über eine präparative RP18-HPLC (Polygosil C-18/Macherey-Nagel, 5 μ , 250 x 20 mm) mit einem Wasser/Acetonitril/0,1 % Trifluoressigsäure-Gradienten bei 60 °C bis zur chromatographischen Einheitlichkeit gereinigt.

Die Analyse der gereinigten PNA wird mit MALDITOF-MS durchgeführt.

Beispiel 3

HGV-Amplifikatnachweis mit verschieden modifizierten Detektionssonden

Ein Vergleich einer erfindungsgemäßen Detektionssonde zu unmodifizierten oder anders modifizierten PNA-Ru Sonden unter Verwendung einer identischen Sequenz verdeutlicht die Vorteile der Erfindung. Als Referenz wurde eine DNA-Sonde eingesetzt. das Experiment wurde am Beispiel HGV durchgeführt.

a) Amplifikation

Zur Herstellung der getesteten PCR-Produkte (HGV bzw. HBV), die als Proben in dem Beispiel dienten, wurden Plasmide verwendet, die mittels PCR amplifiziert wurden. Für die Herstellung der spezifischen Amplifikate wurden die folgenden Primer verwendet:

HGV Primer Sequenzen:

coding-strand:

5'-CGG CCA AAA GGT GGT GGA TG-3' 20-mer (SEQ.ID.NO 1)

non-coding strand:

5'-Bi-CGA CGA GCC TGA CGT CGG G-3' 19-mer (SEQ.ID.NO. 2)

HBV Primer Sequenzen:

coding-strand:

5'-GGA GTG TGG ATT CGC ACT-3' 18-mer (SEQ.ID.NO. 3)

non-coding strand:

5'-TGA GAT CTT CTG CGA CGC-3' 18-mer (SEQ.ID.NO.4)

Für die PCR wurde für beide Parameter der folgende Reaktionsansatz gewählt:

2,5 U Taq polymerase

10 mM Tris/HCl, pH 8.3

50 mM KCl

1,5 mM MgCl₂

0,1 mg/ml Gelatine

200 nM dCTP, dATP, dGTP, 600 mM dUTP

200 nM coding-strand primer

200 nM non-coding strand primer, Biotin-markiert

10 ng plasmid pJCP (HGV: Nukleotide 1-550 kloniert in pGEM3z; Stratagene: HBV:

Nukleotide 50-2670 kloniert in pUC 18)

Die Amplifikation wurde mit folgendem Temperaturprofil auf einem Perkin Elmer Cycler 9600 durchgeführt:

35 Zyklen:

15 sec	94°C
30 sec	55°C
30 sec	72°C
hold	4°C

Um das Amplifikat zu stabilisieren, wurde das PCR-Produkt nach Beendigung der Reaktion mittels des High pure PCR template purification kits (BM Best.No. 1 796 828) gereinigt. Zur Bewertung der verschiedenen PNA-Ru Sonden wurde das PCR-Produkt in den bezeichneten Verdünnungen eingesetzt.

b) Detektion

Die Detektion erfolgte mit Hilfe von Elektrochemilumineszenz (ECL) auf einem Elecsys® 1010 (Boehringer Mannheim GmbH). Reaktionstemperatur für alle Schritte ist 37°C. 10 µl Probe werden zunächst mit 35 µl Denaturierungsreagenz versetzt und für 5 Minuten inkubiert. Anschließend werden 120 µl der Sondenlösung (50 ng/ml in Hybridisierungspuffer) zugegeben und 20 min inkubiert. Nach Beendigung der Hybridisierung werden dem Reaktionsansatz 35 µl Streptavidin-beschichtete magnetische Mikropartikel beigemischt und dieser erneut 10 Minuten inkubiert. Die Hybride (Bio-markierter HGV Strang mit Ru-markierter Detektionssonde) werden dabei an die Festphase (Mikropartikel) gebunden. Nach Beendigung der Inkubation werden die Proben in die Meßzelle transferiert und dort die Mikropartikel über einen Magneten gebunden. Anschließend erfolgt in der Meßzelle die Chemilumineszenz. Unter Katalyse von TPA gibt der Ru-Komplex Lichtblitze ab, deren Anzahl in der Meßzelle bestimmt werden. Die Chemie zur Elektrochemilumineszenz ist im J. Electrochem. Soc. 137: 3127-3131 beschrieben.

Detektionsreagenzien:

1. Denaturierungsreagenz, pH > 12

Einsatzstoff	Ident.-Nr.	Konzentration
Natriumhydroxid	0004464	0.05 N
Natriumchlorid	0004324	154 mM (0.9 %)
Dodecyl-di-Me-Ammoniopropylsulf.	1112899	0.1 %
VE-Wasser	0030163	

Hybridisierungslösung, pH 6.5:

Einsatzstoff	Ident.-Nr.	Konzentration
Na-Dihydrogenphosphat x 1 Wasser	0013978	62.5 mM
Na-Monohydrogenphosphat x 2 Wasser.	0004537	
Natriumchlorid	0004324	variabel
Dodecyl-di-Me-Ammoniopropylsulf.	1112899	0.125 %
MIT	1085905	0,01 %
Oxypyron		0,1 %
RPLA I	1726536	0,0625 %

Als Detektionssonden wurden folgende Rutheniumbispyridkomplexe-markierten Sonden verwendet:

A. DNA-Sonde:

Ru- CCA CTA TAG GTG GGT CTT Id.Nr. 55 (SEQ.ID.NO. 5)

B. PNA-Sonden:

Ru Glu₂ CCA CT(TGlu)A TAG GT(TGlu)G GGT CTT Gly Id. Nr. 506

Ru Gly₃ CCA CTA TAG GTG GGT CTT Gly Id. Nr. 487

Ru Glu₂ CCA CTA TAG GTG GGT CTT Glu Id. Nr. 493

Ru Gly₃ CCA CT(TLys)A TAG GT(TLys)G GGT CTT Gly Id. Nr. 494

Die Sonden wurden im oben beschriebenen Experiment getestet, das Ergebnis ist in Tabelle 4 wiedergegeben. Der erste Teil (4a) gibt den Mittelwert der Signale aus einer Doppelbestimmung wieder, der zweite (4b) zeigt das Verhältnis des Signals zum Hintergrundsignal.

Die wichtigsten Erkenntnisse sind:

- Die Integration von TGlu im Backbone führt zu einer deutlichen Reduktion des Hintergrundes und ist vergleichbar mit der Referenz (DNA-Sonde)
- Die Modifikation führt zu einer Verbesserung der Sensitivität der PNA-Sonde, die Sensitivität ist vergleichbar mit der Referenz. Dies ist insbesondere in Tab. 4b deutlich zu sehen.
- Im Gegensatz zur Referenz verschlechtert sich die Sensitivität nicht bei einer niedrigen Salzkonzentration im Hybridisierungspuffer. Die Konkurrenzreaktion zwischen unmarkiertem Strang aus der PCR-Reaktion mit der Detektionssonde wird bei niedriger

Salzkonzentration zur Sonde hin verschoben, was einen großen dynamischen Meßbereich bei sehr guter Sensitivität ermöglicht.

- Die modifizierte Sonde gemäß der Erfindung erlaubt die Abdeckung eines besonders großen dynamischen Meßbereiches, was besonders für die quantitative Detektion wichtig ist
- Bei den unmodifizierten PNA-Sonden bzw. bei der positiv geladenen PNA-Sonde erhöht sich der Hintergrund mit sinkender Salzkonzentration

Beispiel 4Reduktion des Leerwertes und der unspezifischen Kreuzreaktivität bei ECL-Messungen

Die Durchführung des Experimentes ist in Beispiel 3 beschrieben. Als Probenmaterial wurde ein mit Biotin-markierter Längenstandard (entspr. Cat.No. 1062590, nur 5' Biotin-markiert) verwendet. Die Konzentration der Stocklösung: 1 µl entspr. 250 ng DNA.

Folgende Detektionssonden wurden verwendet:

A. DNA-Sonde:

Ru- CCA CTA TAG GTG GGT CTT (SEQ.ID.NO. 5)	Id.Nr. 55
--	-----------

B: PNA-Sonden:

Ru Glu ₂ CCA CT(TGlu)A TAG GT(TGlu)G GGT CTT Gly	Id. Nr. 506
---	-------------

Ru Gly ₃ TAT AGG TGG GTC TT Gly	Id. Nr. 484
--	-------------

Ru Gly ₃ ACT ATA GGT GGG TCT T Gly	Id. Nr. 486
---	-------------

Das Ergebnis ist in Tabelle 5 wiedergegeben. 5a gibt den Mittelwert der Signale aus einer Doppelbestimmung wieder, 5b zeigt das Verhältnis des Signals zum Hintergrundsignal.

Die wichtigsten Erkenntnisse sind:

- Unspezifische Hybridisierungsreaktionen sind nur mit den beiden unmodifizierten PNA-Sonden zu beobachten, nicht jedoch mit der erfindungsgemäß modifizierten Sonde oder mit der Referenz.
- Die Stärke der unspezifischen Reaktionen nimmt mit der Länge der unmodifizierten Sonden zu (484: 14-mer; 486: 16-mer).

Tabelle 5
5a

Probe	Sonde Salz	55		506		484		486	
		0 mM	50 mM	625 mM	0 mM	50 mM	625 mM	50 mM	625 mM
HGV PCR Produkt	1:5	246843	424834	666051	1211085	1184377	332695	1331089	823696
	1:25	149673	260813	728338	795203	893928	427947	787229	873993
	1:125	64415	100840	338543	308401	327337	238796	293682	337931
	1:625	3850	5651	17490	20053	19520	14311	15307	19104
	1:3125	3028	4609	13937	13965	15148	12732	4324	6090
	1:15625	1188	1314	2528	2844	3475	2784	3944	5204
H ₂ O		880	879	890	1204	1408	1239	3084	4432
HGV Primer		871	852	876	2186	2622	1494	9225	10845
Langenmarkerr VI	1:100	739	743	900	1075	1266	1836	22773	29318
	1:20	774	782	878	1462	1865	1344	38744	46311
	1:10	811	809	867	1307	1524	1288		140360
HBV PCR Produkt	1:5	834	856	904	921	1123	1225		

5b

Probe	Sonde Salz	55		506		484		486	
		0 mM	50 mM	625 mM	0 mM	50 mM	625 mM	50 mM	625 mM
HGV PCR Produkt	1:5	280,5	483,3	748,4	1005,9	841,2	268,5	431,2	185,9
	1:25	170,1	296,7	818,4	660,5	634,9	345,4	255,0	197,2
	1:125	73,2	114,7	380,4	256,1	232,5	192,7	95,1	76,2
	1:625	4,4	6,4	19,7	16,7	13,9	11,6	5,0	4,3
	1:3125	3,4	5,2	15,7	11,6	10,8	10,3	1,4	1,4
	1:15625	1,4	1,5	2,8	2,4	2,5	2,2	1,3	1,2
H ₂ O		1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
HGV Primer		1,0	1,0	1,0	1,8	1,9	1,2		
Langenmarker VI	1:100	0,8	0,8	1,0	0,9	0,9	1,5	3,0	2,4
	1:20	0,9	0,9	1,0	1,2	1,3	1,1	7,4	6,6
	1:10	0,9	0,9	1,0	1,1	1,1	1,0	12,6	10,4
HBV PCR Produkt	1:5	0,9	1,0	1,0	0,8	0,8	1,0		

Beispiel 5**Einfluß des Salzgehaltes auf die Sensitivität des Nukleinsäurenachweises**

Analog zu Beispiel 3 wurde HGV mit Hilfe einer DNA-Sonde (Schaubild 1), einer positiv geladenen PNA-Sonde (Schaubild 3) und zweier negativ geladener Sonden (Schaubilder 2 und 4) bestimmt. Dabei wurde der Salzgehalt (0; 50; 150; 200; 300; 625 mM) variiert. Die Messergebnisse sind in FIG 2 graphisch gezeigt. Die Ergebnisse sind in der Beschreibung diskutiert.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH

(B) STRASSE: Sandhoferstr. 116

(C) ORT: Mannheim

(E) LAND: DE

(F) POSTLEITZAHL: 68305

(G) TELEFON: 0621 759 4348

(H) TELEFAX: 0621 759 4457

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Modifizierte Nukleinaeureanaloge

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGGCCAAAAG GTGGTGGATG

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CGACGAGCCT GACGTCGGG

19

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GGAGTGTGGA TTCGCACT

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

TGAGATCTTC TGCGACGC

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid"

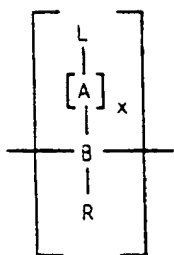
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CCACTATAGG TGGGTCTT

18

Ansprüche

1. Mit Nukleinsäuren hybridisierendes Molekül mit einem Grundgerüst aus linear miteinander verknüpften Monomereinheiten, wobei mindestens eine der Monomereinheiten eine nichtnukleosidische Einheit ist, die eine Säurefunktion mit einem pK_a von weniger als 3.0 enthält.
2. Molekül gemäß Anspruch 1 enthaltend mindestens eine nicht-nukleosidische Monomereinheit der Formel I

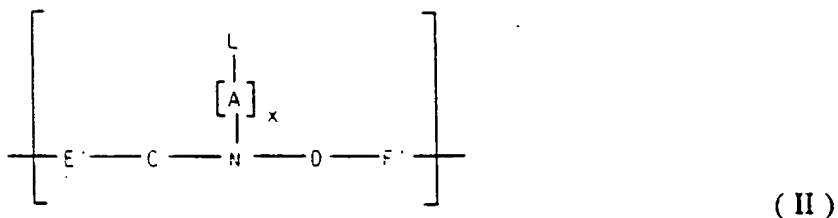


(I)

worin

- L ausgewählt ist aus der Gruppe Wasserstoff, Hydroxyl, $(C_1 - C_4)$ - Alkanoyl, nukleobasenbindende Gruppe, $(C_6 - C_{14})$ -Aromaten. Heterocyclen mit Stickstoff-, Sauerstoff- oder/und Schwefel-Atomen, Interkalatoren und Reportergruppen,
- A ein Abstandshalter mit einer Länge von 1 bis 3 Atomen,
- x eine Zahl zwischen 0 und 3,
- B eine Grundgerüsteinheit mit einer Länge von zwischen 4 und 8 Atomen,
- R eine Gruppe enthaltend eine Säurefunktion mit einem pK_a von weniger als 3.0 bedeuten.
3. Molekül gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß L über A an ein Stickstoffatom in B gebunden ist.
 4. Molekül gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß R nicht an das Stickstoffatom gebunden ist.

5. Molekül gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Monomereinheit die Formel II aufweist,



worin

E' und F' unabhängig voneinander CO, CS, SO, SO₂ oder NR¹,

wobei R¹ ausgewählt ist aus der Gruppe Wasserstoff und (C₁-C₃)-Alkyl

N ein Aminstickstoffatom,

C (CR²R³)_n oder CR²R³CR⁴R⁵

wobei

R², R³, R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe Wasserstoff, C₁-C₆-(substituiertes oder unsubstituiertes) Alkyl, Hydroxyl, Carboxyl und einer die Säurefunktion enthaltenden Gruppe, und

n eine Zahl zwischen 1 und 4 ist, und

D (CR²R³)_n oder CR²R³CR⁴R⁵

wobei

R², R³, R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe Wasserstoff, C₁-C₆-(substituiertes oder unsubstituiertes) Alkyl, Hydroxyl, Carboxyl und einer die Säurefunktion enthaltenden Gruppe, und

n eine Zahl zwischen 1 und 4 ist,

bedeuten.

6. Molekül gemäß Anspruch 5. dadurch gekennzeichnet. daß D abgeleitet ist von Serin oder einem Homologen von Serin.
7. Molekül gemäß einem der vorangehenden Ansprüche. dadurch gekennzeichnet, daß die Säurefunktion ausgewählt ist aus den Gruppen der Sulfonsäuren, der Phosphonsäuren oder der Phosphorsäuren.
8. Molekül gemäß einem der vorangehenden Ansprüche. dadurch gekennzeichnet, daß die Säurefunktion über einen Abstandshalter A' von zwischen 1 und 20 Atomen Länge an linear aufeinanderfolgende Atome des Grundgerüsts gebunden ist.
9. Molekül gemäß Anspruch 8. dadurch gekennzeichnet. daß der Abstandhalter A' die Formel III



hat, in der

A¹ Sauerstoff, NR⁶ oder Schwefel,

A² ein substituierter oder unsubstituierter Alkylen-, Alkinylen- oder Alkenylen-rest.

A³ Sauerstoff, Schwefel oder NR⁶,

R⁶ unabhängig H oder Alkyl oder Acetyl,

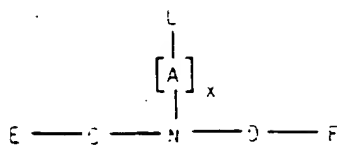
a und c unabhängig voneinander eine Zahl von 0 bis 2.

b eine Zahl von 1 bis 10, und

d eine Zahl von 1 bis 4

bedeuten.

10. Molekül der Formel IV



(IV)

in der

- L ausgewählt ist aus der Gruppe Wasserstoff, Hydroxyl, (C₁-C₄)-Alkanoyl, nukleobasenbindende Gruppe in geschützter oder ungeschützter Form, (C₆-C₁₄)-Aromaten, Heterocyclen mit Stickstoff-, Sauerstoff- oder/und Schwefel-Atomen, Interkalatoren und Reportergruppen,
- A ein Abstandshalter mit einer Länge von zwischen 1 und 3 Atomen.
- x eine Zahl zwischen 0 und 3.
- E und F unabhängig voneinander COOX, CSOX, SO₂X, SO₃X oder NR¹Y, wobei
- R¹ ausgewählt ist aus der Gruppe Wasserstoff und (C₁-C₃)-Alkyl,
- X ausgewählt ist aus der Gruppe Wasserstoff, der Schutzgruppen und der Aktivierungsgruppen.
- Y ausgewählt ist aus der Gruppe Wasserstoff und der Schutzgruppen.
- N ein Aminstickstoffatom, und
- C und D unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe (CR²R³)_n und CR²R³CR⁴R⁵ wobei
- R², R³, R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe Wasserstoff, C₁-C₆-(substituiertes oder unsubstituiertes) Alkyl, Hydroxyl, Carboxyl und einer Säurefunktion mit einem pK_s von weniger als 3.0 enthaltenden Gruppe in geschützter oder ungeschützter Form, und

n eine Zahl zwischen 1 und 4 ist.

11. Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit einer Nukleinsäure in einer Probe, bei der zu vermuten ist, daß sie eine oder mehrere andere Nukleinsäuren enthält, deren Basensequenz sich von der Basensequenz der nachzuweisenden Nukleinsäure in einer oder mehreren Positionen unterscheidet, enthaltend die Schritte

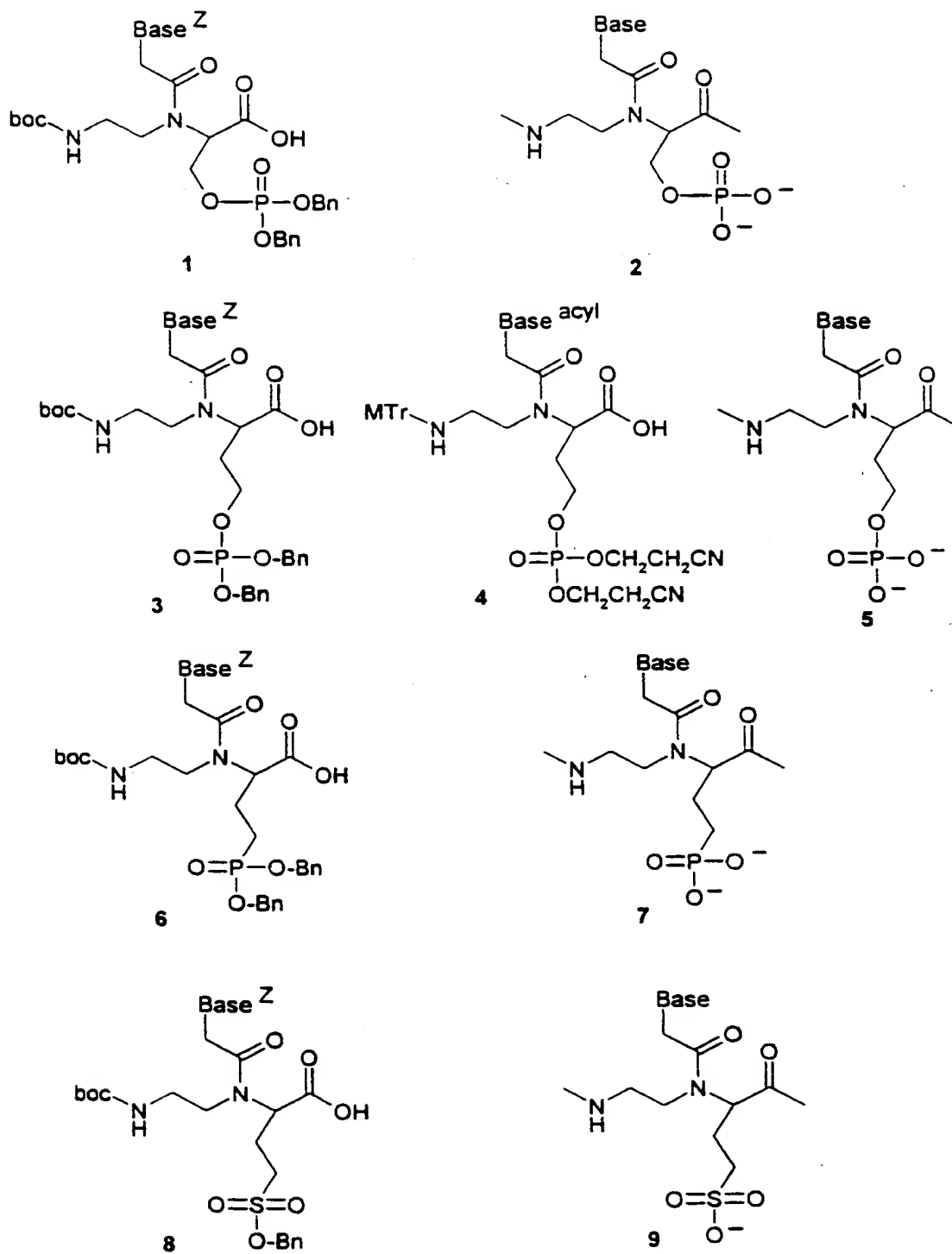
- Inkontaktbringen einer Sonde, welche eine zu der nachzuweisenden Basensequenz, nicht jedoch einer Basensequenz der anderen Nukleinsäuren komplementäre Basensequenz enthält und
- Feststellung, ob eine Bindung der Sonde an eine zu der Basensequenz komplementäre Basensequenz stattgefunden hat,

dadurch gekennzeichnet, daß als Sonde ein Molekül verwendet wird, bei dem weniger als 80 %, jedoch mindestens eine der Basen an negativ geladene Grundgerüsteinheiten gebunden sind.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß sich die nicht-nukleosidische Grundgerüsteinheit an der unterschiedlichen Position von mindestens einer der beiden benachbarten Grundgerüsteinheiten unterscheidet.
13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß sich die unterschiedliche Position am Ende der Basensequenz befindet.
14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde eine Markierung trägt.
15. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung ein Ruthenium-bispyridyl-Komplex ist.

16. Verwendung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13 zum Nachweis von Mutationen, Allelen oder Polymorphismen.
17. Verwendung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13 zur Typisierung oder Subtypisierung von Mikroorganismen.
18. Verwendung von negativen Ladungen in Sonden, die mindestens eine nicht-nukleosidische Grundgerüsteinheit enthalten, zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Sonden an Basensequenzen, die zu weniger als 50 % komplementär zu der Sonde sind oder an feste Träger.
19. Verwendung von Säurefunktionen zur Erhöhung der Selektivität von Sonden in Bindereaktionen.
20. Verwendung von mit Nukleinsäuren hybridisierenden Molekülen, bei denen mindestens eine der Basen an eine nicht-nukleosidische negativ geladene Grundgerüsteinheit gebunden ist, als Primer zur Polymerase katalysierten Verlängerung mit Hilfe von Mononukleosidtriphosphaten.
21. Verwendung von nukleinsäurebindenden Molekülen, bei denen mindestens eine der Basen an eine nicht-nukleosidische negativ geladene Grundgerüsteinheit gebunden ist zur Transfektion in Zellen mit Hilfe von Transfektionsreagenzien.

FIG 1



D-Isomere



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 14/00, C12Q 1/68		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/33867
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. Juli 1999 (08.07.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/08317		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 18. Dezember 1998 (18.12.98)		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(30) Prioritätsdaten: 197 57 516.1 23. Dezember 1997 (23.12.97) DE		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 2. September 1999 (02.09.99)	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERGMANN, Frank [DE/DE]; Faltergatter 5, D-82393 Iffeldorf (DE). VON DER ELTZ, Herbert [DE/DE]; In der Au 21, D-82362 Weilheim (DE). HERRMANN, Rupert [DE/DE]; In der Au 23, D-82362 Weilheim (DE). KÖHLER, Stefanie [DE/DE]; Würmstrasse 22a, D-82319 Starnberg (DE). SCHLÜTER, Volker [DE/DE]; Keplerweg 5, D-82152 Planegg (DE).			
(74) Anwalt: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).			

(54) Title: MODIFIED NUCLEIC ACID ANALOGUES

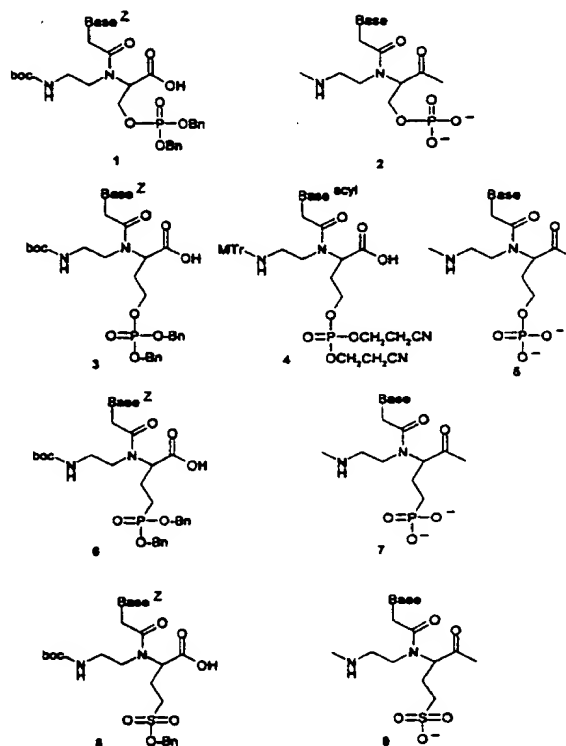
(54) Bezeichnung: MODIFIZIERTE NUKLEINSÄUREANALOGA

(57) Abstract

Oligomers comprising at least one non-nucleoside unit containing an acid function with a pK_a that is lower than 3.0 are particularly suitable as detection probes for nucleic acids as non-specific interactions are reduced in comparison with unmodified oligomers. Even when the concentration of hybridisation buffers is low, it is possible to obtain high signal dynamics and high sensitivity for a low blank signal. Said oligomers are also suitable as primers for lengthening reactions using polymerases and for transfection.

(57) Zusammenfassung

Oligomere mit mindestens einer nicht-nukleosidischen Einheit, die eine Säurefunktion mit einem pK_a von weniger als 3.0 enthält, eignen sich besonders als Nachweissonden für Nukleinsäuren, da die unspezifischen Wechselwirkungen verglichen mit unmodifizierten Oligomeren herabgesetzt sind und gerade bei niedrigen Salzkonzentrationen des Hybridisierungspuffers eine hohe Signaldynamik und Sensitivität bei niedrigem Leerwertsignal erreicht werden kann. Darüber hinaus eignen sie sich auch als Primer für Verlängerungsreaktionen mit Hilfe von Polymerasen und zur Transfektion.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/08317

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K14/00 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	GB 2 284 208 A (PNA DIAGNOSTICS A/S) 31 May 1995 see example 2 ---	1-8
A	WO 96 35705 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC.) 14 November 1996 see page 25 ---	1-8
X	WO 96 11205 A (ISIS PHARMACEUTICALS & D BUCHARDT) 18 April 1996 see in particular pages 66-69, 96-97 and 117 -----	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 June 1999

Date of mailing of the international search report

30/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/08317

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2284208	A	31-05-1995	AT 169632 T	15-08-1998
			AU 684118 B	04-12-1997
			AU 1107595 A	13-06-1995
			CA 2176745 A	01-06-1995
			DE 69412509 D	17-09-1998
			DE 69412509 T	28-01-1999
			WO 9514708 A	01-06-1995
			EP 0730602 A	11-09-1996
			ES 2122516 T	16-12-1998
			JP 9504050 T	22-04-1997
			US 5843663 A	01-12-1998
			ZA 9409317 A	24-05-1996
WO 9635705	A	14-11-1996	AU 5856596 A	29-11-1996
WO 9611205	A	18-04-1996	AU 3999495 A	02-05-1996
			EP 0804456 A	05-11-1997
			JP 10503524 T	31-03-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/08317

A. KLASSTFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K14/00 C1201/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GB 2 284 208 A (PNA DIAGNOSTICS A/S) 31. Mai 1995 siehe Beispiel 2	1-8
A	WO 96 35705 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC.) 14. November 1996 siehe Seite 25	1-8
X	WO 96 11205 A (ISIS PHARMACEUTICALS & D BUCHARDT) 18. April 1996 siehe insbesondere SS. 66-69, 96-97 und 117	1-8



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Juni 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

30/06/1999

Name und Postanschnitt der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Masturzo, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/08317

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB 2284208 A	31-05-1995	AT 169632 T	15-08-1998
		AU 684118 B	04-12-1997
		AU 1107595 A	13-06-1995
		CA 2176745 A	01-06-1995
		DE 69412509 D	17-09-1998
		DE 69412509 T	28-01-1999
		WO 9514708 A	01-06-1995
		EP 0730602 A	11-09-1996
		ES 2122516 T	16-12-1998
		JP 9504050 T	22-04-1997
		US 5843663 A	01-12-1998
		ZA 9409317 A	24-05-1996
WO 9635705 A	14-11-1996	AU 5856596 A	29-11-1996
WO 9611205 A	18-04-1996	AU 3999495 A	02-05-1996
		EP 0804456 A	05-11-1997
		JP 10503524 T	31-03-1998